



**Universidade:
presente!**

UFRGS
PROPEAQ



XXXI SIC

21. 25. OUTUBRO. CAMPUS DO VALE

Evento	Salão UFRGS 2019: SIC - XXXI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2019
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CÉLULA COM MÚLTIPLAS FLUORESCÊNCIAS
Autor	LUIZA CHEROBINI PEREIRA
Orientador	GUIDO LENZ

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CÉLULA COM MÚLTIPLAS FLUORESCÊNCIAS

Luiza C. Pereira, Guido Lenz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Um dos maiores desafios no estudo do câncer atualmente é o desenvolvimento de resistência a tratamentos, que está fortemente relacionada à heterogeneidade tumoral, na qual células são fenotípica e geneticamente diferentes entre si dentro de uma mesma massa tumoral. Nesse cenário surgiram as análises de células únicas, que têm se estabelecido como uma estratégia para observar variações no comportamento celular que não podem ser observados em estudos populacionais. Tecnologias como sequenciamento de células únicas, imunofluorescência e citometrias de fluxo são frequentemente utilizadas para esses estudos, porém as mesmas envolvem preparo trabalhoso de amostras e uso de reagentes e equipamentos caros. Uma alternativa são as co-marcações celulares, onde diferentes proteínas pertencentes a rotas metabólicas relacionadas ou distintas são marcadas e analisadas por microscopia de fluorescência, possibilitando a correlação de efeitos biológicos e o acompanhamento de células individuais, sem que haja a necessidade de preparo de amostra e reagentes dispendiosos. Tendo isso em vista, foi desenvolvida uma célula com múltiplas fluorescências nucleares e citoplasmáticas e o objetivo desse trabalho é validar essas co-marcações.

Para a produção da célula, foram utilizados vetores lenti e retrovirais. Os plasmídeos pBabe-puro-IMS-RP, pBABEpuro mTurquoise2 LC3B e Apple-53BP1trunc – que codificam um peptídeo intermembrana da mitocôndria fusionado ao mRFP1, mimetizando a localização da proteína diablo, a proteína LC3B fusionada à proteína fluorescente mTurquoise2 e 53BP1 truncado fusionado à proteína fluorescente mApple, respectivamente – foram adquiridos da Addgene e amplificados por mini e midiprep. Este DNA foi adicionado a um mix contendo os plasmídeos necessários para a produção viral (Rev, RRE, VSV-G) e foram transfectados em células empacotadoras HEK-293T com auxílio de Polyethylenimine (PEI). Após 48h, o sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado, adicionado a células de glioblastoma da linhagem A172 e centrifugado com polibreno para ocorrer a transdução. Para o imageamento dessas células co-transduzidas foi utilizado o microscópio invertido Axiovert 200 da Zeiss, e o equipamento In Cell Analyzer 2200. As imagens foram analisadas por quantificação de luz, tamanho e organização de estruturas, utilizando-se o software ImageJ.

A primeira transdução realizada foi a de 53BP1, que foi posteriormente selecionada com puromicina. A partir dessas células, foi transduzido o IMS e finalmente o LC3B. Também foram feitas transduções em células selvagens para serem utilizadas como controles. As células finais foram nomeadas P, para a 53bp1; D, para as com o IMS marcado; L para LC3B; PD para as que foram transduzidas com 53BP1 e IMS; e PDL para as triplamente transduzidas. Ao final, foram obtidas 14% células triplas, 16,2% células PD, 26% D e 44,3% LC3B.

Quando tratadas com cisplatina, as células P e PD apresentaram mesma resposta ao dano no DNA. O mesmo não foi possível de ser avaliado em células triplas devido a limitações nas ferramentas de microscopia. Células D, quando tratadas com rotenona, apresentam uma perda na intensidade de fluorescência do marcador de IMS, entretanto o mesmo não pôde ser observado em células PD e PDL por limitações dos equipamentos. Como perspectiva, pretende-se alterar o marcador IMS por outra fluorescência com medida mais precisa.

